Münster 1937 No 154 Med DiSS

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster i. Westf.

Über den Einfluß des Papains auf körpereigene Wirkstoffe

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität
zu Münster

vorgelegt von

Walter Surmann
aus Bochum-Werne

1937

Druck: Heinrich Pöppinghaus o. H.-G., Bochum-Langendreer.

Dekan: Prof. Dr. Jötten.
Referent: Prof. Dr. Lendle.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

I. Einleitung.

Durch Untersuchungen von Grochowiak[1]) ist es gezeigt worden, daß bei der Papainverdauung aus Gelatine, Fibrin und Lebergewebe keine neuen pharmakologisch wirksamen Stoffe, auch keine histaminähnlichen Substanzen entstehen. Das Verfahren der Papainverdauung hat sich dabei als besonders geeignet erwiesen zur schonenden Freilegung praeformierter körpereigener Substanzen. Ähnliche Versuche wurden deshalb auch mit Haemoglobin, Serum und Muskelgewebe unternommen. Die gesamten Stoffe wurden nach Verdauung mit Papain in verschiedener Weise aufgearbeitet und auf pharmakologisch wirksame Substanzen untersucht.

1) J. Grochowiak, Inaug.-Diss. Münster/Westf. 1935.

II. Versuche mit Haemoglobin.

Bei den Versuchen mit Haemoglobin wurden 10 g Haemoglobin Merck mit 100 ccm a.ua dest. versetzt und zur Lösung und Inaktivierung von Fermenten und Bakterien im siedenden Wasserbad 15 Minuten erhitzt. Nach Abkühlung wurden 100 ccm „Acetatgemisch" (= 50 ccm n/1 Essigsäure + 50 ccm n/1 essigsaures Natrium) 0,2 g Papain (= proteolytisches Ferment des getrockneten Milchsaftes der unreifen Früchte von Carica Papaya)) und 5 ccm Toluol zugesetzt. Nach etwa 48stündiger Bebrütung bei 40 ° C wurden 10 g Trichloressigsäure zur Eiweißfällung zugesetzt. Das abgenutschte eiweißfreie (Sulfosalicylsäureprobe) Filtrat wurde im modifizierten Soxlethapparat mehrere Stunden zur Entfernung überschüssiger Trichloressigsäure mit Aether extrahiert und im Vakuum bei 45—50 ° C zur Trockene verdampft. Der Trockenrückstand wurde in 40 ccm aq. dest. aufgenommen, mit Natronlauge gegen Lakmus neutralisiert und mit aq. dest. auf 50 ccm aufgefüllt. 1 ccm dieses „Tr-Filtrates" entsprach 0,2 g Haemoglobin. Das Tr-Filtrat wurde am Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose und am isolierten Kaninchendarm pharmakologisch untersucht. Durch Verwendung von Kaninchen in tiefer Aethernarkose konnten histaminähnliche Stoffe — die den Blutdruck unter diesen Umständen steigern — von adenosinartigen, cholinähnlichen und anderen depressorisch wirkenden Stoffen unterschieden werden. Die Vorbehandlung der Blutdrucktiere oder des isolierten Darmes mit Atropin erlaubte eine Trennung von atropinfesten

adenosinartigen und atropinempfindlichen cholinähnlichen Substanzen.

Das Tr-Filtrat aus Haemoglobin wirkte auf den Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose senkend. Durch Atropinvorbehandlung des Tieres wurde die depressorische Wirkung leicht abgeschwächt. Am isolierten Kaninchendünndarm in der Anordnung nach Magnus trat reine Hemmung ein.

Das Tr-Filtrat, also der wässrige Extrakt des mit Papain verdauten Haemoglobins, enthielt demnach keine histaminähnlichen Substanzen, dagegen adenosinartige und wahrscheinlich auch cholinähnliche Stoffe. Eine Neubildung von pharmakologisch wirksamen Spaltprodukten unter dem Einfluß der Papainwirkung war nicht festzustellen.

Auch bei Einwirkung eines speziell zur Histaminextraktion angegebenen Verfahrens von Best, Dale, Dudley und Thorpe[1]) konnte kein Histamin nachgewiesen werden. Das Verfahren kam dabei in folgender Form in Anwendung: 10 g Haemoglobin wurden in 100 ccm aq. dest. aufgelöst und 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Zusatz von 100 ccm „Acetatgemisch", 0,2 g Papain und 5 ccm Toluol wurde der Ansatz etwa 72 Stunden bei 40° C bebrütet und anschließend mit 500 ccm 96%igem Alkohol versetzt. Nach 24stündigem Stehen wurde abgenutscht, das Filtrat mit Schwefelsäure (4 ccm 20% H_2SO_4 auf 1000 ccm Filtrat) angesäuert und 24 Stunden im Eisschrank gehalten. Nach Abnutschen wurde das Filtrat neutralisiert und im Vakuum bei 40—50° C auf 70 ccm eingeengt. Durch Zusatz von absolutem Alkohol wurde eine 80%ige alkoholische Lösung hergestellt, die mit drei Volumteilen Aceton versetzt wurde. Nach 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank wurde die entstandene Acetonfällung von der überstehenden Flüssig-

1) C. H. Best, H. H. Dale, H. W. Dudley und W. V. Thorpe, Journ. of physiol. **62**, 397 (1927).

keit abgetrennt. Die Acetonfällung wurde nun bei gelinder Wärme getrocknet, in 50 ccm aq. dest. gelöst und in zwei gleiche Teile geteilt. Die 25 ccm des ersten Teiles wurden mit 2,5 ccm 37%iger Salzsäure versetzt, zwei Stunden im siedenden Wasserband hydrolysiert, mit NaOH neutralisiert und auf 35 ccm mit aq. dest. aufgefüllt. Die 25 ccm des zweiten Teiles wurden ebenfalls mit 2,5 ccm 37% HCl versetzt, aber sofort, ohne Hydrolyse, neutralisiert und mit aq. dest. auf 35 ccm aufgefüllt. Beide Lösungen wurden pharmakologisch analysiert.

Die „Acetonfällung" senkte den Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose. Auch nach Vorbehandlung mit Atropin trat die depressorische Wirkung in abgeschwächter Form auf. Am isolierten Kaninchendünndarm folgte auf eine Hemmung Erregung. Der atropinisierte Darm reagierte nur mit Hemmung.

Nach milder Säurehydrolyse blieb eine depressorische Wirkung erhalten, die nach Atropinvorbehandlung verschwand. Der Darm wurde durch das Hydrolysat erregt. Manchmal ging der Erregung eine kurze Hemmung voraus. Die Erregung konnte durch Atropin unterdrückt werden.

Nach diesen Versuchen waren in der „Acetonfällung", die nach Best, Dale, Dudley und Thorpe 70% der körpereigenen depressorischen Wirkstoffe enthalten soll, kein Histamin oder sog. histaminähnliche Substanzen vorhanden. Eine Neubildung von kreislaufaktiven Substanzen trat bei der Papainverdauung nicht ein. Dagegen wurden aus dem Hämoglobin durch das Papain körpereigene praeformierte Wirkstoffe freigelegt. Wie bei den wässrigen Tr-Filtraten konnten adenosinartige und cholinähnliche Stoffe festgestellt werden.

III. Versuche mit Serum.

Die Versuche mit Serum waren ähnlich angeordnet: 20 ccm frisches Rinderblut wurden mit aq. dest. auf 100 ccm verdünnt, mit 100 ccm „Acetatgemisch", 0,2 g Papain und 4 ccm Toluol versetzt und 24 Stunden bei 40° C bebrütet. Die weitere Behandlung war dieselbe wie bei der Herstellung der Haemoglobin-Tr-Filtrate.

Der Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose wurde durch das Serum-Tr-Filtrat gesenkt. Atropinvorbehandlung des Versuchstieres schwächte die depressorische Wirkung etwas ab. Der isolierte Kaninchendünndarm wurde durch das Tr-Filtrat vorwiegend gehemmt. Manchmal schloß sich eine erregende Wirkung an. Durch Atropin wurde die Erregung ausgeschaltet, während die hemmende Wirkung erhalten blieb.

Das Serum-Tr-Filtrat enthielt also vorwiegend adenosinartige Stoffe und daneben cholinähnliche Substanzen. Histamin konnte nicht nachgewiesen werden, ebenso keine anderen pharmakologisch wirksamen Eiweißaufbauprodukte.

Zum gleichen Ergebnis führten Verdauungsversuche mit Papain unter gleichzeitiger Dialyse: 20 ccm frisches Rinderserum wurden mit aq. dest. auf 100 ccm verdünnt, mit 100 ccm „Acetatgemisch", 0,2 g Papain und 4 ccm Toluol versetzt. Der Ansatz wurde in Dialysierhülsen (Schleicher und Schüll) gefüllt und gegen aq. dest. dialysiert. Nach 24 Stunden wurde das destilierte Wasser erneuert und die Dialyse weitere 24 Stunden fortgesetzt. Dia Dialysate wurden im Vakuum bei 45—50° C eingedampft, der Trockenrückstand in 40 ccm aq. dest.

gelöst und nach Neutralisation auf 60 ccm mit aq. dest. aufgefüllt.

Das Dialysat enthielt nach Versuchen am Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose und am isolierten Kaninchendarm adenosinartige Stoffe und in geringer Menge cholinähnliche Substanzen.

Die „Acetonfällung" wurde in derselben Weise hergestellt wie in den Hämoglobinversuchen: 20 ccm frisches Rinderserum wurden mit aq. dest. auf 100 ccm verdünnt, mit 100 ccm „Acetatgemisch", 0,2 g Papain und 5 ccm Toluol versetzt. Nach 48 Stunden Bebrütung bei 40° C wurde in der oben beschriebenen Weise verfahren. Die Acetonfällung wurde in 40 ccm aq. dest. gelöst und in zwei gleiche Teile geteilt. Die ersten 20 ccm wurden mit 2 ccm 37% HCl zwei Stunden im siedenden Wasserbad hydrolysiert, neutralisiert und auf 25 ccm mit aq. dest. aufgefüllt. Die andere Hälfte von 20 ccm wurde nach Zusatz von Salzsäure sofort ohne Hydrolyse neutralisiert und mit aq. dest. ebenfalls auf 25 ccm aufgefüllt.

Die „Acetonfällung" senkte den Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose. Atropin schwächte die depressorische Wirkung erheblich ab. Der Darm wurde durch das Dialysat gehemmt. Die hydrolysierte „Acetonfällung" senkte den Blutdruck ebenfalls. Der Darm zeigte unter der Einwirkung der hydrolytischen „Acetonfällung" nach kurz vorübergehender geringer Hemmung eine erregende Wirkung. Nach Atropinvorbehandlung des Darmes fiel die erregende Wirkung weg, die hemmende Wirkung blieb erhalten.

Die „Acetonfällung" auf frischem Rinderserum enthielt kein Histamin, keine histaminähnlichen Substanzen und keine anderen pharmokologisch wirksamen Eiweißspaltprodukte. Die nachgewiesenen adenosinartigen Stoffe und cholinähnlichen Substanzen lassen sich auch ohne Papainbehandlung im Serum nachweisen.

IV. Versuche mit Muskelgewebe.

Zu diesen Versuchen wurde Muskulatur vom Kaninchen und Hund in frischem und gealterten Zustande verwendet.

48 g frische Kaninchenmuskulatur wurde nach Zerkleinern in der Fleischmaschine mit 100 ccm aq. dest. aufgeschwemmt, mit 100 ccm „Acetatgemisch", 0,2 g Papain und 5 ccm Toluol versetzt und 24 Stunden bei 40° C bebrütet. Nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure wurde in der oben angegebenen Weise verfahren.

In ähnlicher Weise wurden die Versuche mit Hundemuskulatur durchgeführt. Bei den Untersuchungen mit gealtertem Muskelgewebe wurde die Verarbeitung erst nach mehrstündigem Lagern des nicht zerkleinerten Gewebes bei Zimmertemperatur vorgenommen.

Die Herstellung der „Acetonfällung" aus frischem und gealtertem Muskelgewebe geschah nach dem bereits oben geschilderten Verfahren. Die in aq. dest. gelöste „Acetonfällung" wurde jeweils in einer hydrolysierten und nicht hydrolysierten Fraktion untersucht.

Die Ergebnisse entsprachen den von Grochowiak[1]) mit Kaninchenleber erhaltenen Befunden.

Das Tr-Filtrat aus frischer und gealterter Muskulatur enthielt vorwiegend adenosinartige Stoffe und geringe Mengen von cholinähnlichen Substanzen. Auch die „Acetonfällung" hatte am

1) I. Grochowiak, Inaug.-Diss. Münster.

Blutdruck des Kaninchens, am Kaninchendünndarm und am Meerschweinchenuterus vorwiegend Adenosinwirkung. Die cholinähnlichen Substanzen traten auch hier in den Hintergrund. Histamin, histaminähnliche Stoffe und andere pharmakologisch wirksame Eiweißspaltprodukte wurden durch die Papainverdauung weder neu gebildet noch freigelegt. Die nachgewiesenen adenosinartigen und cholinähnlichen Stoffe sind als muskeleigene Stoffe hinreichend bekannt.

V. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1.) Aus Haemoglobin, Serum, frischem und gealtertem Muskelgewebe entstehen durch Papainproteolyse keine neuen pharmakologisch aktiven Spaltprodukte. Histamin oder histaminähnliche Substanzen werden nicht gebildet.

2.) Aus Haemoglobin und Rinderserum werden durch Papainverdauung praeformierte adenosinartige und cholinähnliche Stoffe, dagegen keine histaminähnlichen Substanzen freigemacht.

3.) Aus frischem und gealtertem Muskelgewebe des Hundes und Kaninchens können durch Papaineinwirkung praeformierte adenosinartige und cholinähnliche Stoffe, aber keine histaminähnlichen Substanzen gewonnen werden.

Lebenslauf.

Ich wurde am 4. April 1906 als Sohn des Landwirts Dietrich Surmann und seiner Ehefrau Sophie geb. Gerling zu Bochum-Werne geboren. 1924 bestand ich an dem Realgymnasium zu Bochum-Langendreer mein Abitur und besuchte die Universitäten Marburg, Bonn, Köln, Frankfurt und Münster, wo ich April 1936 mein medizinisches Staatsexamen bestand.